

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

CAROLINE DAL PONT GONÇALVES

AVALIAÇÃO DOS DANOS GENOTÓXICOS AO DNA DE CAMUNDONGOS
EXPOSTOS A HORTALIÇAS CULTIVADAS SOBRE DEPÓSITOS
CONTROLADOS DE REJEITOS DE CARVÃO

CRICIÚMA, 2012

CAROLINE DAL PONT GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DOS DANOS GENOTÓXICOS AO DNA DE CAMUNDONGOS
EXOPOSTOS A HORTALIÇAS CULTIVADAS SOBRE DEPÓSITOS
CONTROLADOS DE REJEITOS DE CARVÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Moraes de Andrade

CRICIÚMA, 2012

CAROLINE DAL PONT GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DOS DANOS GENOTÓXICOS AO DNA DE CAMUNDONGOS
EXOPOSTOS A HORTALIÇAS CULTIVADAS SOBRE DEPÓSITOS
CONTROLADOS DE REJEITOS DE CARVÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do
grau de Bacharel em Farmácia da Universidade do
Extremo Sul Catarinense, UNESC.

CRICIÚMA, 29 DE NOVEMBRO 2012

BANCA EXAMINADORA

Vanessa Moraes de Andrade - (UNESC) - Orientador

Prof^a. Ângela Erna Rossato - MSc - (UNESC)

Prof^a. Maria Júlia F. Corrêa Angeloni - MSc - (UNESC)

É com imenso carinho que dedico esse trabalho aos meus pais Arilton e Denir, por todo amor e dedicação nesta minha pequena jornada!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por me dar grandes oportunidades, e por botar em minha vida pessoas essenciais.

Aos meus pais, **Arlton e Denir**, pelo amor, exemplo de vida, por serem meu porto seguro e pela minha formação moral e intelectual que permitiram meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A minha irmã **Daiani**, minha inspiração, pelo apoio, carinho e paciência.

A minha orientadora, **Vanessa Moraes de Andrade**, pelos ensinamentos, dedicação, confiança, e amizade no desenvolvimento do TCC.

Ao meu noivo **Anderson de Bom**, pelo carinho e paciência, e por ter permanecido ao meu lado nos momentos em que mais precisei.

A todas as minhas **amigas** do coração, quarta rachences e não quarta rachences, que me deram força, e entenderam as minhas ausências.

As amigas de verdade conquistadas nessa jornada, pelo valor que não foi provado apenas nos momentos de alegria, mas principalmente nos momentos de dificuldades e tristezas, quando até as lágrimas por terem sido compartilhadas, foram bem menos dolorosas, obrigada do fundo do coração **Cleidiane, Alessandra, Liege e Tatiana** por todos os ótimos momentos.

A todos os professores do curso de Farmácia, principalmente à **Angela Erna Rossato e Juliana Lora**, não apenas pelo conhecimento proporcionado, mas também pelo carinho, paciência e principalmente pela amizade estabelecida.

As meninas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, **Daniela, Adriani, Karina, Gabriela, Mayelen e Vitor Hugo** pela paciência, compreensão e

dedicação nos experimentos e, principalmente, por me ajudarem na análise dos dados;

Aos **animais do laboratório**, que com suas vidas proporcionaram notória contribuição ao desenvolvimento de novas técnicas e tratamentos médicos, convergindo significativamente para o avanço da ciência e trazendo benefício para a nossa saúde.

Enfim, a todas as pessoas cuja minha falta de memória não permitiu colocar os nomes no papel, mas que em seu momento, foram muito importantes...

Muito obrigada!

A ciência humana de maneira nenhuma, nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.

(Galileu Galilei)

RESUMO

A mineração de carvão é um dos setores básicos da economia, e fundamental ao desenvolvimento do país, contribuindo de forma significativa para a melhoria da qualidade de vida das presentes e futuras gerações, no entanto é uma atividade com alto nível de poluição ambiental, gerando grandes quantidades de rejeitos e causando disseminação de metais pesados no meio ambiente. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de danos genotóxicos e mutagênicos no DNA de células do sangue periférico, fígado e córtex de camundongos expostos a hortaliças cultivadas em horta experimental construída sobre depósitos controlados de rejeitos do carvão. Para isso utilizou-se a seguinte metodologia, 18 animais foram divididos em 3 grupos conforme o tipo de tratamento: Controle negativo (solução salina 0,9%), suco alface mina, suco alface orgânica. Estes animais receberam uma única administração destas 3 substâncias e após 3h, 6h e 24hs da ingestão foi feita a coleta de sangue. No tempo de 24hs os animais foram mortos por decapitação e foram retirados córtex cerebral, medula e fígado para as demais análises de genotoxicidade/mutagenicidade. Após a coleta do sangue, fígado e córtex realizou-se o ensaio cometa para avaliar a genotoxicidade Com a amostra de medula óssea realizou-se o teste de micronúcleo para avaliar o potencial mutagênico. Os resultados indicaram um nível maior de danos para ambos os parâmetros do ensaio cometa nos animais do grupo alface mina em relação aos controles em todas as horas de exposição. Os resultados do teste de micronúcleo não tiveram diferenças estatísticas significativas. Concluímos que o rejeito de carvão é potencialmente genotóxico, e que a alface *Lactuca sativa* L. pode ser uma boa indicadora na detecção e bioacumulação de metais pesados no ecossistema.

Palavras-chave: Rejeito de carvão mineral, *Lactuca sativa* L., ensaio cometa, teste de micronúcleo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização dos municípios nas Bacias Carbonífera Catarinense.....	12
Figura 2: Corpos cônicos de rejeitos em Santa Catarina.....	13
Figura 3: Esquema geral propondo possíveis vias de indução da carcinogênese..	19
Figura 4: Visualização do Ensaio Cometa EC.....	23
Figura 5: Classificação do dano na célula de acordo com o tamanho da cauda....	23
Figura 6: Esquema geral da formação de MN.....	24
Figura 7: Eritrócitos policromáticos (EPC) e Eritrócitos normocromáticos (ENC)...	25
Figura 8: Etapas experimentais do Teste Cometa da coleta das células a leitura em microscópio óptico.....	30
Figura 9: Classes de Dano obtidas pelo Teste Cometa.....	31
Figura 10: Detecção de dano no DNA através do parâmetro Índice de Dano do Ensaio Cometa em células do sangue periférico de camundongos no período de exposição de 24h,* Diferença significativa em relação aos demais grupos ($P < 0,05$, Teste de Kruskal-Wallis- Dunn).....	34
Figura 11: Detecção de dano no DNA através do parâmetro Frequência de Dano do Ensaio Cometa em células do sangue periférico de camundongos no período de exposição de 24h,* Diferença significativa em relação aos demais grupos ($P < 0,05$, Teste de Kruskal-Wallis- Dunn).....	35
Figura 12: Detecção de dano no DNA através do parâmetro Índice de Dano do Ensaio Cometa em células do córtex cerebral e fígado no período de exposição de 24h.* Diferença significativa em relação aos grupos controle ($P < 0,01$ ANOVA, Tukey).....	36
Figura 13: Detecção de dano no DNA através do parâmetro Frequência de Dano do Ensaio Cometa em células do córtex cerebral e fígado no período de exposição de 24h.* Diferença significativa em relação aos grupos controle ($P < 0,01$ ANOVA, Tukey).....	37
Figura 14: Relação EPC/ENC e frequência de micronúcleos na medula óssea dos animais de todos os tratamentos no período de 24h de exposição.....	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 CARVÃO.....	11
1.2 METAIS PESADOS, CARVÃO MINERAL E GENOTOXICIDADE.....	14
1.3 BIOMARCADORES E BIOMONITORES.....	19
1.3.1 Alface <i>Lactuca sativa</i> L.....	21
1.4 GENÉTICA TOXICOLÓGICA AMBIENTAL.....	21
1.4.1 Ensaio Cometa EC	22
1.4.2 Ensaio de micronúcleos.....	23
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	28
3.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	28
3.2 ANIMAIS.....	28
3.3 PREPARO DA AMOSTRA.....	28
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL.....	28
3.5 ENSAIO COMETA <i>IN VIVO</i>	29
3.6 TESTE DE MICRONÚCLEO (MN) EM MEDULA ÓSSEA.....	31
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	32
4 RESULTADOS.....	33
5 DISCUSSÃO.....	39
6 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

A poluição é um sério problema ambiental que vem sendo enfrentado em todo o mundo, em um sentido amplo pode ser entendida como a introdução de qualquer matéria ou energia no meio ambiente que transforme suas características, tornando-o impróprio aos organismos que normalmente o habitam, levando a condições desfavoráveis à vida em um determinado biótopo (LEMOS, 2003).

A mineração de carvão é considerada uma forma de poluição, e quando confrontada a outras fontes de degradação do ambiente, como a agricultura e a pecuária, percebe-se que ela afeta diretamente pequenas extensões. No entanto, se os elementos solubilizados dos rejeitos, atingirem os cursos d'água, podem impactar negativamente áreas localizadas a centenas de quilômetros da mineração (SALOMONS, 1995).

O crescimento desordenado e o deslocamento dos núcleos habitacionais das médias e grandes cidades para a periferia vêm, no decorrer dos anos, criando dificuldades à mineração, gerando o conflito população versus mineração. No entanto em Santa Catarina acontece o contrário, ou seja, há o avanço da mineração em sub-superfície na direção das habitações já existentes na periferia das grandes cidades (RIBEIRO; FERREIRA, 2007). Mesmo com a exploração sendo uma importante atividade econômica, além de uma indispensável fonte de energia para o País, os impactos ambientais gerados são de grande magnitude (DNPM-BRASIL, 2007), pois modificam a estrutura do meio natural (CAMPOS, 2003).

E conforme a ANEEL (2007), entre todas as etapas de produção e consumo do carvão, o principal impacto é o socioambiental provocado. A extração, por exemplo, provoca a degradação das áreas de mineração e a combustão é responsável por emissões de gás carbônico.

A mineração de carvão gera comprometimento ambiental considerável, que vai desde a alteração da paisagem até a contaminação do solo, e este fato não impede o estabelecimento de algumas plantas, e com a construção de moradias ao redor das áreas mineradas, instalou-se junto o plantio e o uso de hortaliças e ervas medicinais, as quais apresentam risco genotóxico pelo fato de estarem diretamente em contato com os metais tóxicos e mutagênicos através de suas raízes. Dessa forma os metais representam um problema à saúde humana, pois são

biomagnificados ao longo da cadeia alimentar (COSTA, 2007; 2009; FREITAS et al., 2007; ZOCHE, 2005; 2008).

A mineração é um dos setores básicos da economia do país, e vem contribuindo de forma decisiva para o bem estar e a melhoria da qualidade de vida das presentes e futuras gerações, sendo fundamental para o desenvolvimento de toda região sul de Santa Catarina, desde que seja operada com responsabilidade social, e estando sempre presente e em primeiro lugar, os princípios do desenvolvimento sustentável (FREITAS, 2002; COSTA, 2009).

1.1 CARVÃO

O carvão mineral é um combustível fóssil, composto por uma estrutura química heterogênea altamente complexa de componentes orgânicos, constituídos por carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre, componentes inorgânicos e partículas discretas de matéria mineral, que formam as cinzas (LEÓN et al., 2007).

Esses compostos, intimamente misturados, apresentam fases sólidas, líquidas e gasosas de origem orgânica e antropogênica (LEFFA; ANDRADE, 2008; LIU et al., 2005).

O carvão nada mais é do que restos de vegetação pré-histórica que originalmente se desenvolveu em áreas pantanosas, e que para chegar à fase do carvão mineral, passou por um processo de carbonificação, onde os restos vegetais ao longo do tempo se solidificam em ambiente anaeróbio, perdem oxigênio e hidrogênio e se enriquecem em carbono (LOPES, 2009).

É o combustível natural mais abundante na natureza e o mais utilizado como fonte de energia elétrica no mundo (ANEEL, 2007), constituindo dois terços dos recursos energéticos não-renováveis nacionais, sendo suas reservas vinte vezes maiores do que as do petróleo e setenta e cinco vezes superiores às do gás natural (CAMPOS; ALMEIDA; SOUZA, 2003).

Uma das maiores reservas de carvão da América Latina está localizada no Brasil, e os depósitos de maior importância econômica são encontrados nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (SOARES et al., 2006), distribuindo-se em oito grandes jazidas, sete das quais no Rio Grande do Sul, e uma em Santa Catarina (GOMES et al., 1998), os dois estados detêm conjuntamente 99,8% das reservas carboníferas do país (DNPM, 2004).

O carvão catarinense foi descoberto em 1822 por tropeiros que desciam a serra do "12", em direção a Laguna e os primeiros trabalhos de exploração em Santa Catarina ocorreram na região de Lauro Muller provocando profundas modificações no ambiente (BARBOSA, 2001; MARTINS, 2005).

A Bacia Carbonífera de Santa Catarina, também conhecida com jazida *Sul - Catarinense*, está localizada ao sudeste do estado, possui um comprimento conhecido de 95 km e uma largura média de 20 km, compreendida na área delimitada pelas coordenadas 28011' a 29003' de latitude sul e 49010' a 49037' de longitude oeste (GOMES et al, 1998; BARBOSA, 2001), (Figura 1).

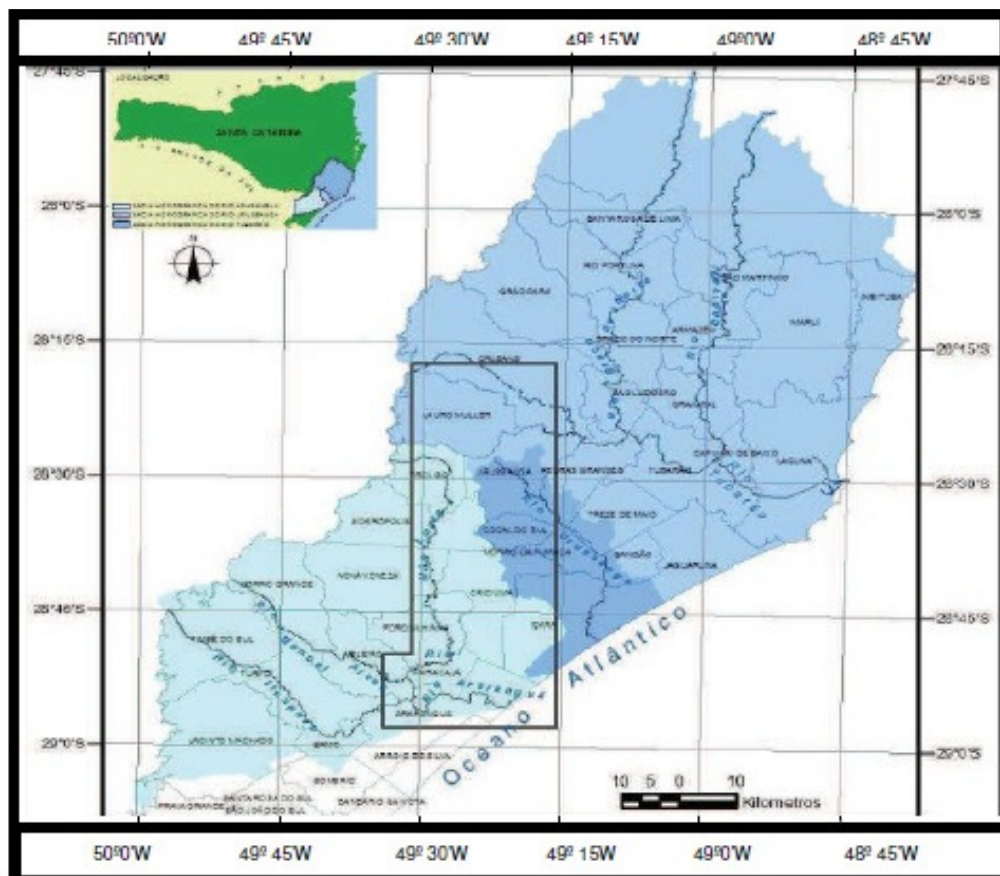


Figura 1: Localização dos municípios na Bacia Carbonífera Catarinense. Fonte: CETEM, 2001).

Os municípios inseridos na bacia carbonífera catarinense são: Orleans, Lauro Muller, Urussanga, Siderópolis, Criciúma, Içara, Nova Veneza, Maracajá, Araranguá, Arroio do Silva, Forquilha e Treviso (MILIOLLI, 2009).

A exploração de carvão nessas áreas é realizada em minas subterrâneas e a céu aberto, sendo a profundidade da camada carbonífera um dos critérios para

seleção entre os métodos de lavra, ou seja, a lavra subterrânea é utilizada quando a jazida de carvão se encontra em camadas mais profundas (cerca de 30m até aproximadamente 120m) e a lavra a céu aberto é utilizada, quando a jazida de carvão se encontra próxima à superfície do solo até, aproximadamente, 30m de profundidade (KLEIN, 2006).

No processo de mineração a céu aberto, a remoção das camadas é feita de forma desordenada, provocando a sua inversão e gerando pilhas de materiais geológicos na forma de corpos cônicos (figura 2), que têm na sua base a camada fértil do solo e na camada superior, os estéreis e rejeitos da mineração, causando, portanto, perda de solo fértil e sua degradação (CAMPOS; SOUZA, 2003).



Figura 2: Corpos cônicos de rejeitos em Santa Catarina.
Fonte: DALOTTO; LOCH, 2001.

Hoje em dia, muitos campos de mineração e áreas de depósitos efetuados sem critérios técnicos ou controlados já não se encontram mais ativos.

Mas infelizmente, o término da lavra não significa o fim do método poluidor, nem o esgotamento da fonte geradora de poluição, pois, os rejeitos carbonosos os quais compõem o passivo ambiental gerado, continuam reativos por muito tempo comprometendo o restabelecimento das comunidades vegetais terrestres e aquáticas, e conseqüentemente, compromete o desenvolvimento de

toda a comunidade biótica subsequente e o uso futuro de tais áreas (COSTA, 2009; ZOCHE, 2005; ZOCHE, FREITAS et al., 2007).

1.2 METAIS PESADOS, CARVÃO MINERAL E GENOTOXICIDADE

Os elementos traços também conhecidos como “metais pesados”, são freqüentemente definidos pelo seu peso atômico, possuindo um valor maior que 23, e densidade igual ou superior a 5 gcm⁻³ (COSTA, 2005; PORTO, 2009. São constituintes normais de todos os ecossistemas (COSTA; ZOCHE; SOUZA, 2007), e em concentrações muito pequenas, são considerados essências do ponto de vista biológico (PRONCHOW, 2000). De uma forma geral os metais são classificados como essenciais e não essenciais, os essenciais denominados oligoelementos como o manganês, ferro, zinco, cobre e selênio, encontram-se fisiologicamente presentes nos organismos vivos, e com elevada incidência, são encontrados naturalmente em alimentos, frutas e multivitamínicos.

Enquanto alguns são essenciais, outros são classificados como não essenciais, como o chumbo e o cádmio, e são potencialmente tóxicos e indutores de efeitos biológicos adversos mesmo em concentrações reduzidas (LOPES, 2009).

Mesmo os metais pesados sendo considerados essenciais, quando presentes em grandes concentrações provocam alterações físicas, químicas e biológicas do solo (LIMA, 2008), apresentando alta toxicidade aos organismos vegetais e animais, produzindo efeitos danosos aos mesmos (DAMIANI, 2010; POZZA, 2001).

Os metais pesados podem ser encontrados em todos os compartimentos do ecossistema, sempre existiram no planeta e nunca se esgotam. São oriundos de fontes naturais e/ou antrópicas como intemperismo de rochas, deposição atmosférica, lançamentos de efluentes urbanos, industriais e agrícolas, além da lixiviação de resíduos contaminados, sendo a mineração e a purificação de minérios um dos grandes causadores da sua disseminação mundial (PASCALICCHIO, 2002).

Pesquisadores classificaram os metais no ambiente em três categorias. No primeiro grupo estão os elementos considerados pouco tóxicos ao meio ambiente os quais, em sua maioria, são tidos como micronutrientes, mas em concentrações elevadas são tóxicos. Pertencem a este grupo o Al, Co, Cu, Mn, Mo, Se, V, Zn e Sn.

O segundo grupo é formado por metais que apresentam uma grande probabilidade de risco de causarem câncer. Pertencem a este grupo o As, Be, Cr e Ni.

O terceiro grupo é representado por metais que apresentam um caráter tóxico significativo e não se enquadram nos grupos anteriores. Fazem parte deste grupo o Pb, Cd, Hg e Tl (LIMA, 2008; RAMALHO; SOBRINHO; VELLOSO, 2000).

O carvão mineral da bacia catarinense traz na sua composição, um alto grau de impurezas, em média, para cada 100 toneladas de matéria prima bruta, 25% é de carvão aproveitável, e 75% de rejeito piritoso, e é essa parte não aproveitável, que é rica nesses tipos de metais pesados (FREITAS, 2006).

Os metais pesados oriundos das atividades de lavra e beneficiamento do carvão são principalmente: arsênio (As), bário (Ba), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg), níquel (Ni), prata (Ag), selênio (Se) e zinco (Zn). Sendo que para muitas destas substâncias químicas há evidências de mutagenicidade e carcinogenicidade em humanos e/ou animais de laboratório (AGOSTINI; WAJNTAL, 1993).

Sendo os mais perigosos por sua toxicidade e potencial de bioacumulação o Cd, Cu, Zn e Pb. (SANTOS; CASALI; MIRANDA, 1999; QUADROS, 2010; BARRONCAS, 1998) e sua toxicidade depende principalmente da sua frequência, disponibilidade e solubilidade (BARRONCAS, 1998).

A mobilidade e retenção de metais pesados no solo dependem das complexas interações com a fase sólida, tanto orgânica quanto inorgânica que envolvem reações de adsorção/dessorção, precipitação/dissolução, complexação e oxirredução (SANTOS; CASALI; MIRANDA, 1999; LIMA, 2008; PÉREZ-ESPITIA, 2011; BARBÉRIO, 2009).

Os problemas ambientais ainda vêm sendo agravados devido ao alto grau de impurezas encontrados nos rejeitos do carvão, sendo eles classificados de acordo com o teor de enxofre contido, em rejeitos piritosos (R-1) e rejeitos carbonosos (R-2 e R-3). O rejeito piritoso, também conhecido como rejeito primário, é composto pelos estéreis mais pesados que compõem a camada de ROM, é o resíduo mais poluente, pois contém a maior quantidade de pirita, e com isto um alto teor de enxofre (10%) e uma concentração de carvão em torno de 8%. Os rejeitos carbonosos são compostos basicamente pelos mesmos estéreis que constituem a R-1, porém possuem quantidades menores de pirita, e dessa maneira possuem uma

quantidade de enxofre inferior (3%) predominando os siltitos e argilitos carbonosos (CREPALDI, 2003; ZILI, 2002).

Segundo Silva et al. (2008) a pirita gera espontaneamente peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila ($\bullet OH$) e, quando em contato com a água, a formação destas espécies reativas de oxigênio (EROs) degradam o RNA, RNA ribossomal e o DNA de leveduras.

Como os rejeitos da mineração normalmente são depositados ao redor das áreas mineradas, expostos ao ar livre e sob a ação do clima, e estas áreas, na maioria das vezes, encontram-se perto do perímetro urbano, onde há a exposição de animais domésticos e seres humanos (LEFFA 2008; ZOCHE, 2008), acabam sendo afetados pelos rejeitos através do uso de plantas medicinais, pastagens para alimento de gado, recursos hídricos para a produção de lavouras e cultivos domésticos. Portanto, a utilização destas áreas deve ser feita com cautela, pois os riscos à saúde humana pela presença de elementos tóxicos no solo e na água ainda são muito grandes.

Estudos revelam que as plantas que crescem sobre áreas ricas em rejeitos de carvão apresentam adaptações fisiológicas, anatômicas e morfológicas em resposta ao estresse provocado pela ação dos metais pesados (COSTA 2009; ZOCHE, 2005; 2008; ZOCHE, FREITAS, QUADROS, 2010).

Vários autores afirmam que espécies vegetais e até cultivares diferem quanto à capacidade de absorção e acúmulo de metais pesados (SANTOS; CASALI; MIRANDA, 1999; MORAES, 2008) podendo ser classificadas desde muito sensíveis até muito tolerantes (BARRONCAS, 1998). Sabe-se também que várias destas plantas são conhecidas como concentradoras ou acumuladoras desses metais pesados, e que ao serem absorvidos e metabolizados por estas plantas tornam-se disponíveis aos animais que as ingerem.

Os metais pesados podem causar efeitos adversos em sistemas biológicos, entre eles, genotoxicidade e carcinogenicidade (PARAÍBA, 2006). Além disso, podem produzir quebras na fita-dupla de DNA (DSBs) indiretamente, através do estresse oxidativo, como descrito por Gastaldo et al. (2009).

Os metais pesados quando absorvidos, tornam-se agentes genotóxicos que interagem quimicamente com o material genético, formando adutos (agentes pré-mutagênicos), alterações oxidativas ou mesmo quebras na molécula de DNA. Na grande maioria dos casos a lesão é reparada pelo próprio organismo ou a célula

é eliminada. Caso essa lesão seja fixada, provocando alterações hereditárias (mutações), que podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação, o agente então é denominado como mutagênico (SOUZA, 2005; MEJÍA, 2011).

Houk (1992) descreveu a importância dos testes genotóxicos e mutagênicos nos estudos de monitoramento ambiental e para a saúde humana, estes utilizam diversos organismos, como por exemplo, microrganismos, insetos, plantas e animais. Os testes podem ser divididos em grupos, com base no sistema biológico empregado e na localização genética detectada. Bioensaios em procariotos detectam agentes que induzem mutações gênicas e danos primários no DNA.

Porém, segundo Mejía (2011), constitui-se em um problema o fato de que os organismos na natureza não estão expostos a um único composto, mas sim a uma complexa mistura de compostos. Assim, técnicas analíticas podem não informar muito no que diz respeito à extrapolação a danos biológicos. Similarmente, estudos epidemiológicos falham principalmente no que se refere à determinação do tempo e condições de exposição, além de ser necessário um longo período de exposição para que algumas doenças se expressem.

Embora os feitos adversos em sistemas biológicos tenham sido atribuídos a genotoxicidade dos metais pesados, já que o excesso pode estimular a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (BENAVIDES, 2005), existem numerosas controvérsias sobre a carcinogênese dos metais pesados em humanos (CAMARGO, 2006). Uma causa muito provável de carcinogênese é o aumento nas lesões do DNA, aumento da geração de espécies reativas do oxigênio e/ou a interferência nos processos de reparo do DNA (ZOCCHÉ; LEFFA; DAMIANI, 2010).

Segundo Benassi (2004) metais como ferro, cobre, cádmio, cromo, níquel, entre outros, possuem a capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), e quando essas espécies são formadas intracelularmente, elas podem induzir peroxidação lipídica, dano ao DNA, depleção de grupamentos tióis, alterar vias de transdução de sinais e a homeostase do cálcio (Figura 3), pois os alvos de ataque das ERO são macromoléculas como os lipídios (peroxidação lipídica), proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (DNA) (HENRIQUES et al., 2001).

As espécies reativas do oxigênio são a fonte mais importante de danos genômicos em humanos. Muitas afecções da saúde física e mental que, além do

câncer, incluem doenças degenerativas comuns e envelhecimento acelerado são atribuídas ao lento desbalanço criado pelo estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio, criado pela excessiva geração de oxidantes e/ou uma diminuição da atividade das enzimas antioxidantes da célula (GUO; YANG; WU, 2008).

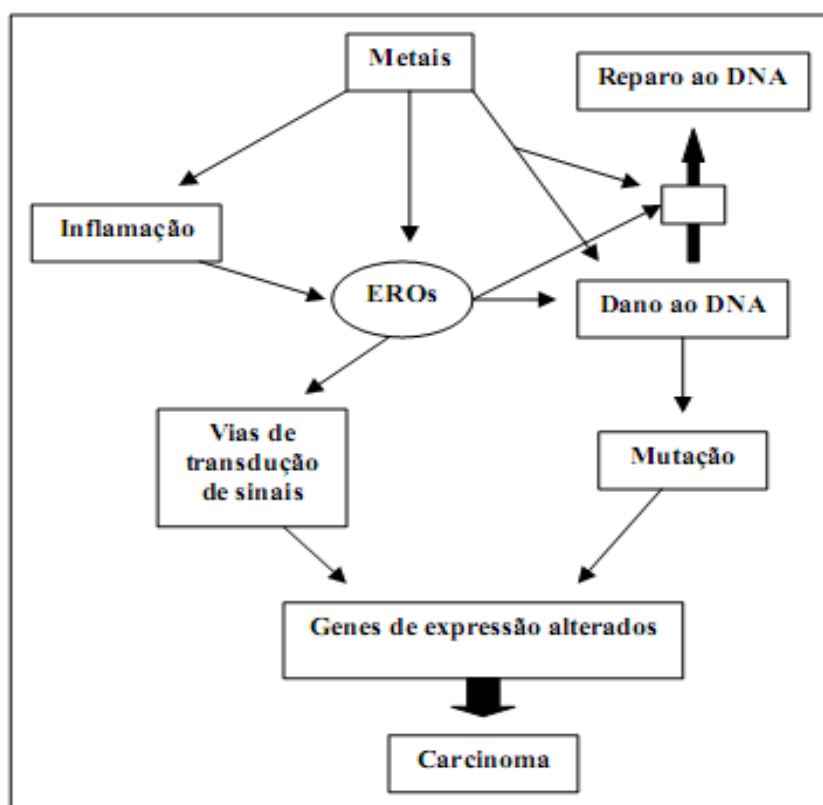


Figura 3. Esquema geral propondo possíveis vias de indução da carcinogênese por metais, adaptada de Galaris e Evangelou (2002).

Fonte: Autor.

Segundo o esquema acima, os metais podem gerar dano ao DNA de forma direta ou indireta pelo desenvolvimento das EROs. A geração das EROs pode ser afetada pelos metais por muitas vias. Por exemplo, através da reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\bullet + \text{HO}^-$), da indução do processo inflamatório, ou através da formação intermediária de tioradicaís ($\text{RSH} + \text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{RS}^\bullet + \text{Cu}^+ + \text{H}^+$).

A maior parte do dano ao DNA é reparada pelo eficiente mecanismo celular de reparo, enquanto que uma pequena parte do dano resulta em mutação. Mudanças nos níveis das EROs também influenciam no equilíbrio redox intracelular,

comprometendo fortemente as vias de transdução de sinais, as quais ativam ou inativam vários fatores de transcrição.

Tanto a mutação quanto os fatores de transcrição podem modular a expressão de uma variedade relevante de genes para a transformação celular, conduzindo finalmente ao desenvolvimento do câncer (BENASSI, 2004).

A toxicidade dos metais, por ser similar em humanos e animais, pode ser avaliada por estudos de investigação experimental em camundongos. Ela também é similar para os diferentes sais e óxidos dos metais e, embora diferentes em termos da absorção e distribuição, levam aos mesmos efeitos, porém de intensidade diferente devido à cinética (MANZINI; SÁ; PLICAS, 2010).

Os metais que não participam de funções biológicas, ou seja, não participam de reações bioquímicas necessárias a manutenção da vida, quando entram no organismo por contaminação exógena, estes elementos são transportados para diversos sítios, interagem de várias formas com a maquinaria celular, e geram uma extensa lista de efeitos tóxicos (SILVA; FREGONEZE, 2002).

Esses metais quando absorvidos através da ingestão, inalação, ou penetração subcutânea, acumulam-se principalmente no fígado e rins de mamíferos, podendo também acumular-se nas células endoteliais e consequentemente destruindo a barreira hematoencefálica, criando uma porta de acesso dos metais ao encéfalo, em crianças e animais jovens, a penetração é facilitada pela imaturidade funcional da barreira hematoencefálica (SILVA; FREGONEZE, 2002).

A toxicidade dos metais esta diretamente relacionada com a dose, tempo de exposição, forma química e física do elemento e sua via de administração/absorção (LOPES, 2009).

Deste modo os metais pesados podem afetar, praticamente, todos os órgãos e sistemas do organismo humano, incluindo alterações nos sistemas neurológico, hematológico, metabólico e cardiovascular (SILVA; FREGONEZE, 2002).

1.3 BIOMARCADORES E BIOMONITORES

Um método de quantificar a exposição de xenobióticos e seu potencial impacto é o uso de procedimentos de monitorização biológica por meio de biomarcadores.

Os biomarcadores podem indicar mudanças bioquímicas, fisiológicas ou morfológicas que se associem a exposição de um agente tóxico. Além disso, podem ser utilizados para avaliar o risco mutagênico e carcinogênico do mesmo (MEJÍA, 2011).

São definidos como qualquer resposta a um contaminante ambiental em nível individual, medido no organismo ou matriz biológica, indicando um desvio do status normal que não pode ser detectado no organismo intacto. Ou seja, são medidas de fluídos corporais, células, tecidos ou medidas realizadas sobre o organismo completo, que indicam, em termos bioquímicos, celulares, fisiológicos, compartimentais ou energéticos, a presença de substâncias contaminantes ou a magnitude da resposta do organismo alvo (ARIAS et al., 2007).

Dentre os testes realizados para avaliação de biomarcadores, destacam-se o teste de aberrações cromossômicas, quantificação de adutos de DNA, troca entre cromátides irmãs, o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo.

Resultados significativos para essas técnicas prenunciam instabilidade genética, que pode representar os passos iniciais para o processo carcinogênico (SOUZA, 2005).

Já os Biomonitores, também conhecidos por organismos sentinela, vêm sendo utilizados há muito tempo para alertar as pessoas sobre ambientes perigosos. Na seleção de um biomonitor os principais aspectos a serem observados são: (a) os animais devem dividir o mesmo ambiente com o homem; (b) responder de forma semelhante a químicos tóxicos; e (c) desenvolver patologias similares como resposta a estes efeitos (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

O fundamental benefício de utilizar organismos sentinela para monitoramento ambiental, confrontado ao método clássico físico-químico, é a informação que ele pode dar em relação à exposição acumulativa em organismos e populações sobre a resposta de letalidade e sub-letalidade, além de detectar efeitos indiretos (BROMENSHENK; SMITH; WATSON, 1995).

Existem diversos organismos que podem ser utilizados como biomonitores e/ou bioindicadores, ou as duas coisas simultaneamente, dentre os quais se destacam as bactérias *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, anelídeos, artrópodes (KOVALCHUK; KOVALCHUK, 2008), microcrustáceos como *Daphnia magna* (ALVES; SILVANO, 2006) animais vertebrados aquáticos como peixes (ANDRADE, et al., 2004), vegetais como as plantas *Allium cepa*,

Tradescantia, *Vicia faba* (KOVALCHUK; KOVALCHUK, 2007), *Baccharis trimera* (SOUZA; COSTA; ZOCHE, 2007), moluscos (SILVA et al. 2007), anfíbios e répteis (BRANDÃO, 2002), aves como os pombos (SCHILDERMAN et al., 1997), e mamíferos como *Ctenomys torquatus* (SILVA, 2000), *Rattus rattus* e *Mus musculus* (LÉON, 2007).

1.3.1 Alface *Lactuca sativa* L.

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta herbácea, pertencente à família Cichoriaceae. Hortaliza típica de saladas com propriedades popularmente conhecidas como tranqüilizantes, e pelo fato de ser consumida crua, conserva todas as suas propriedades nutritivas, sendo uma excelente fonte de vitaminas e minerais (ANDRADE JÚNIOR, 1997).

A alface é uma hortaliza de grande importância econômica no Sul do Brasil (SEGOVIA, et al., 1997), e é considerada uma das espécies mais eficientes na absorção de metais pesados, como cultivares de alface apresentam comportamento diferencial quanto à quantidade e velocidade de absorção de macro e micronutrientes supõe-se que também apresentariam tal comportamento em relação a outros elementos, incluindo metais pesados (SANTOS; CASALI; MIRANDA, 1999).

As plantas são rotas de entrada de metais e poluentes industriais, por isso, a presença de hortaliças em solo degradado pela mineração pode colocar em risco as populações localizadas nas proximidades que muitas vezes exploram a vegetação que se desenvolve espontaneamente sobre áreas de rejeitos de mineração ou mesmo que cultivam frutas e vegetais neste solo (COSTA; ZOCHE, 2009).

1.4 GENÉTICA TOXICOLÓGICA AMBIENTAL

A genotoxicidade é o campo da genética que estuda os fatores que alteram a base genética da vida, em sua estrutura físico-química, o DNA (ácido desoxirribonucléico), sendo este processo, chamado de mutagênese. A genotoxicidade estuda como o organismo se encontra exposto a algum agente tóxico, analisando o que perturba a vida ou induz a morte, tanto em nível de célula como de organismo. É uma especialidade recente que se situa entre toxicologia e

genética, por isso é também denominada genética toxicológica (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

A genética toxicológica engloba o estudo dos prováveis causadores de genotoxicidade e seus mecanismos de ação. Quando estes estão inseridos ou têm repercussão no meio ambiente ou na biota, podemos especializar o conceito de genética toxicológica para genética toxicológica ambiental (BORTOLOTTI, 2007).

O ataque oxidativo ao DNA tem se mostrado um dos principais efeitos que governam a genotoxicidade de amostras contaminadas com metais, os catalisadores metálicos usados no processo de síntese têm sido apontados como a principal fonte dos efeitos genotóxicos (FRANCHI, 2011)

1.4.1 Ensaio Cometa EC

O ensaio cometa é uma das técnicas mais utilizadas para detecção de genotoxicidade, não sendo utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas, que após serem processadas podem resultar em mutação.

Diferente das mutações, as lesões são passíveis de correção, constituindo, portanto, lesões pré-mutagênicas (GAMEIRO, 2005; GONTIJO; TICE, 2003), sendo esta, uma técnica rápida e sensível na quantificação de lesões e detecção de efeitos de reparo no DNA (Singh *et al.*, 1988). O Ensaio Cometa, também chamado de Eletroforese em Gel de Célula única (SCGE), inserido pela primeira vez por Östling e Johanson em 1984, através da técnica microeletroforética para visualização direta dos danos no DNA em células individuais, apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, sendo uma delas, a necessidade de uma pequena quantidade de células, e de não ser necessário células em divisão.

Para tal, as células são englobadas em gel de agarose sobre uma lâmina, e submetidas a uma corrente elétrica com pH alcalino, arrastando o DNA carregado negativamente de dentro do núcleo, permitindo que fragmentos do DNA livre migrem a uma distância considerável, resultando em imagens, que por sua aparência foram denominados “cometas” (Figura 3) (FAIRBAIRN; OLIVE; O’NEIL, 1994).

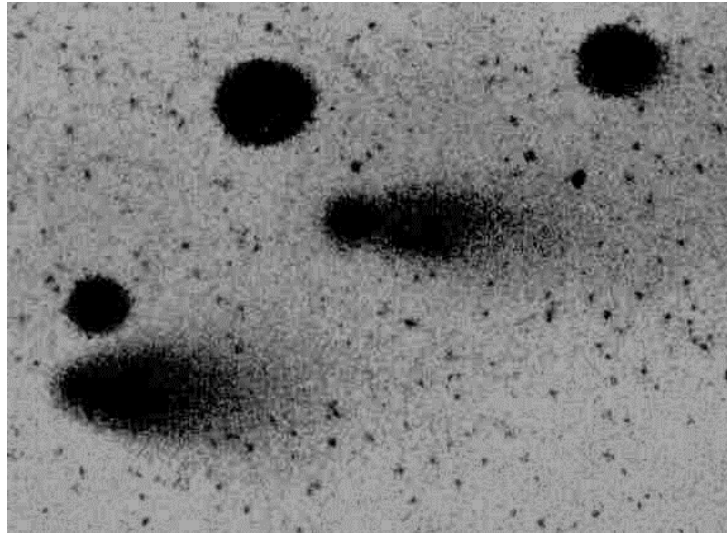


Figura 4: Visualização do Ensaio Cometa EC
Fonte: Autor

Os fragmentos do DNA podem se apresentar em vários tamanhos e para alguns autores o tamanho da cauda é proporcional ao dano que foi causado, mas somente é de consenso que a visualização do “cometa” significa dano à nível do DNA, podendo ser quebras de fita simples, quebras de dupla-fita, sítios álcali-lábeis, sítios abásicos, excisão de sítios incompletos de reparo e ligações cruzadas (TICE et al. 2000),

Os cometas geralmente são classificados em categorias que variam de quatro a cinco, e a identificação de dano no DNA se dá através do comprimento de migração e/ou a proporção relativa de DNA na cauda em relação ao centro conforme a figura 5 (TICE et al., 2000).



Figura 5: Classificação do dano na célula de acordo com o tamanho da cauda.
Fonte: (LEFFA et al, 2010)

1.4.2 Ensaio de micronúcleos

O teste do micronúcleo é um teste mutagênico, que tem sido aplicado com sucesso na detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e

na detecção de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal).

Os micronúcleos aparecem nas células filhas em decorrência de danos, não reparados ou reparados erroneamente, induzidos nas células parentais. Apresentam estrutura similar ao núcleo principal, tendo também o seu DNA recoberto pelo envoltório nuclear. Sua origem se dá durante a divisão mitótica, devido à quebra cromossômica ou atraso cromossômico na anáfase (SOUZA, 2005; MEJÍA, 2011). Dessa forma qualquer fragmento ou cromossomo(s) inteiro(s) separados do núcleo principal, formam um pequeno núcleo, que é denominado de micronúcleo (SILVA, 2008).

As rupturas cromossômicas originam fragmentos cromossômicos acêntricos que, por não possuírem centrômero, não foram incluídos nos núcleos filhos durante a divisão celular, por não poderem se unir ao fuso mitótico na anáfase. Estes fragmentos formam membrana nuclear e aparecem no citoplasma como pequenos núcleos, como podem ser visto na figura 6.

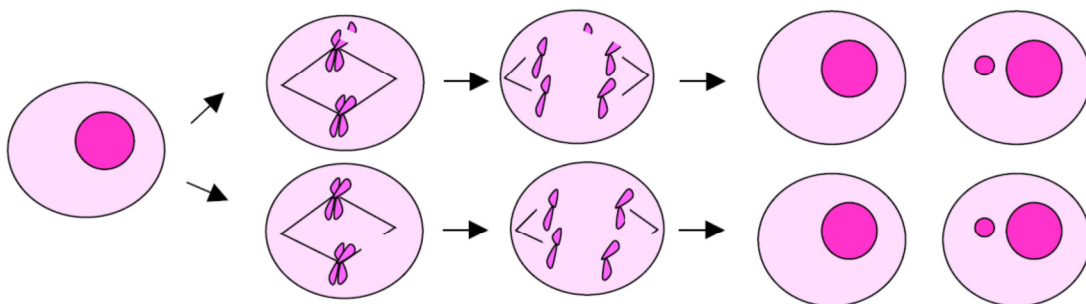


Figura 6: Esquema geral da formação de MN

Fonte: (LEON et AL, 2007)

Autores vêm discutindo o significado da geração do micronúcleo para a célula e o seu destino após sua formação. Elevadas presenças de micronúcleos têm sido correlacionadas com o desenvolvimento de câncer. A inserção de um gene supressor de tumor no micronúcleo e a subsequente perda do mesmo, somados com um acúmulo de mutações poderia gerar neoplasia e, portanto ser uma etapa para a carcinogênese. O micronúcleo, originado a partir de um cromossomo inteiro, pode ainda ser reincorporado no núcleo principal da célula, e se a síntese de DNA no micronúcleo estiver em sincronia com a síntese de DNA no núcleo principal.

O teste do micronúcleo *in vivo*, em sistema teste animal, foi proposto independentemente por Schmid (1975) e Heddle (1973) em eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongo.

Os tecidos relacionados à hematopoese, em função da necessidade da reposição constante das células sangüíneas, apresentam elevada freqüência de divisões celulares, portanto, as células oriundas deste tecido são mais indicadas para a observação de efeitos relacionados aos processos de divisão celular ou ao DNA (GRASSI, 2002).

As hemácias são células abundantes na medula óssea e no sangue periférico de mamíferos, que são especialmente propícias por sua alta rotatividade, ausência de núcleo e pela possibilidade de diferenciar eritrócitos jovens pela presença de RNA (SILVA, 2008).

Os eritrócitos recém formados contêm RNA ribossomal, e são responsáveis pela síntese de hemoglobina, podendo ser diferencialmente corados com Giemsa, corante para ácidos nucléicos, desta forma, são denominados de eritrócitos policromáticos (EPC).

Essas células jovens podem permanecer estáveis entorno de 24 horas após a expulsão do núcleo nas células de mamíferos. Já os eritócitos maduros são denominados de normocromáticos (ENC), por apresentarem apenas hemoglobina (figura 7) (SOUZA, 2008; MAVOURIN et al.,1990; HEDDLE, 1991; HAYASHI et al., 2000).

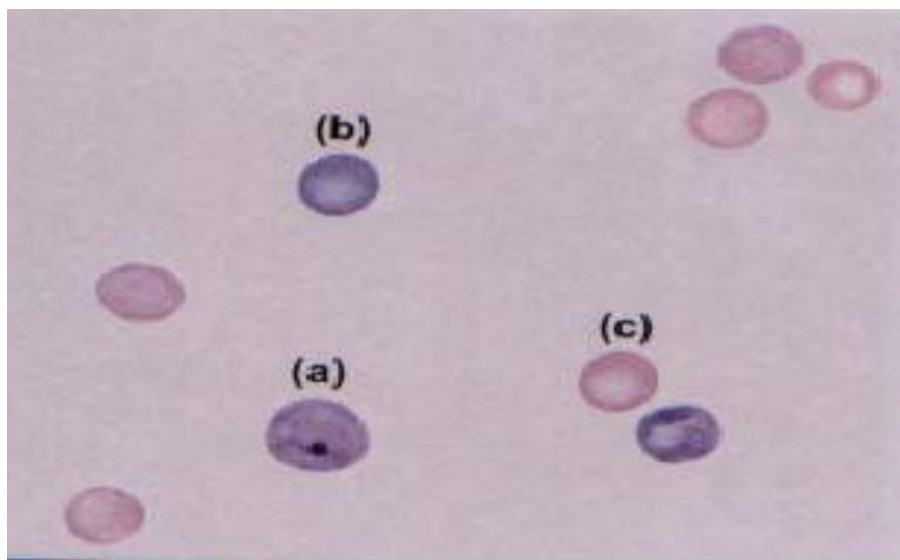


Figura 7(a) Micronúcleo, (b) Eritrócitos policromáticos (EPC) e (c) Eritrócitos normocromáticos (ENC).

Fonte: (LEFFA et al, 2010)

Baseado nesse contexto, o presente estudo considerou a hipótese de que o consumo de hortaliças cultivadas em áreas mineradas apresenta riscos à saúde humana. Dessa forma expomos animais de laboratório ao suco das folhas da alface cultivada em horta experimental de modo a oferecer oportunidade ímpar de testar essa hipótese, e assim avaliar de forma indireta, os riscos que o consumo dos mesmos representam à saúde humana.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de danos genotóxicos e mutagênicos ao DNA de células sanguíneas, hepáticas e cerebrais de camundongos expostos a hortaliças cultivadas em horta experimental construída sobre depósitos controlados de rejeitos do carvão, com intuito de explorar de forma indireta os riscos a saúde humana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o nível de dano em DNA de células sanguíneas, hepáticas e encefálicas de camundongos expostos (grupo teste) e não expostos (grupo controle) a alimentação com suco de alface (*Lactuca sativa* L.) cultivado em horta experimental construída sobre depósitos controlados de rejeitos do carvão.
- Avaliar a mutagenicidade da hortaliça cultivada em horta experimental construída sobre depósitos controlados de rejeitos do carvão sobre em células jovens da medula óssea de camundongos.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.8 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado com hortaliças de duas hortas de áreas distintas de Santa Catarina. A primeira horta estando sob influência direta da mineração do carvão, localizada no município de Forquilha, SC, construída em uma mina sobre um depósito controlado de rejeito de carvão. A segunda horta, no município de Içara que foi definida como horta controle, uma vez que está localizada em uma região livre dos efeitos da mineração.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, adultos, com 60 dias de vida, provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Eles foram divididos em 3 grupos, com 6 indivíduos por grupo, totalizando 18 animais. O trabalho foi realizado de forma aguda onde os animais foram mantidos a temperatura ambiente controlada (23 ± 1 °C) com ciclo claro-escuro de 12 horas, água e comida foram oferecidas *ad libitum*. O trabalho foi realizado após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais, segundo o n° de protocolo 110/2011.

3.3 PREPARO DA AMOSTRA

O modelo animal de exposição à hortaliça se deu por meio de gavagem do suco das folhas da alface (*Lactuca sativa* L.) processados em um processador de frutas aos camundongos, respeitando-se o volume de administração de 0,1mL/10g de peso corporal.

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado através da administração de suco das folhas de alface da mina, alface orgânica e solução salina (NaCl 0,9%), por meio de gavagem. O desenho experimental está ilustrado abaixo:

Os animais foram divididos em 3 grupos conforme descritos a seguir:

- Grupo 1: suco de folhas de alface cultivada sobre depósito controlado de rejeito de carvão.
- Grupo 2: suco de folhas de alface cultivada de modo orgânico.
- Grupo 3: controle negativo mina – solução salina (NaCl 0,9%).

Os animais foram tratados uma única vez (Tratamento Agudo) com os sucos ou controles e tiveram sangue coletado em 3h, 6h e 24h de exposição. Após as 24 horas, os animais foram mortos por decapitação, foi coletado fígado, medula óssea e córtex para as análises de genotoxicidade e mutagenicidade.

3.5 ENSAIO COMETA *IN VIVO*

O emprego do ensaio cometa seguiu os protocolos internacionais já estabelecidos para a sua realização (TICE et al, 2000). Foi coletado aproximadamente 10 µL de sangue periférico de cada animal, sendo que 5 µL de cada amostra foram embebidos em 95 µL de agarose Low Melting Point (0,75%), essa mistura foi colocada em lâmina de microscópico (duas lâminas por animal ou seja, duplicata), pré-revestida com cobertura de 300 µL de agarose normal (1,5 %) e após foi coberta com uma lamínula. Depois da solidificação em geladeira por aproximadamente 5 minutos, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e depois as lâminas foram imersas em tampão de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) com alta concentração de sais e detergentes a fim de lisar as células, removendo o seu conteúdo citoplasmático e membrana nuclear, por no mínimo uma hora ou até duas semanas. Posteriormente, as lâminas são imersas em um tampão de pH 13 de acordo com Tice (1995) (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 13), por 20 minutos. Tal processo visa o desenovelamento das cadeias de DNA, pelo rompimento das estruturas secundárias e terciárias presentes no núcleo celular. Imediatamente ao desenovelamento, as lâminas são submetidas a uma corrente elétrica por mais 20 minutos, 25v e 300 mA, de modo a induzir a migração para fora do núcleo dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, finalmente as lâminas são coradas com nitrato de prata (VILLELA et al, 2006). (Figura 8).

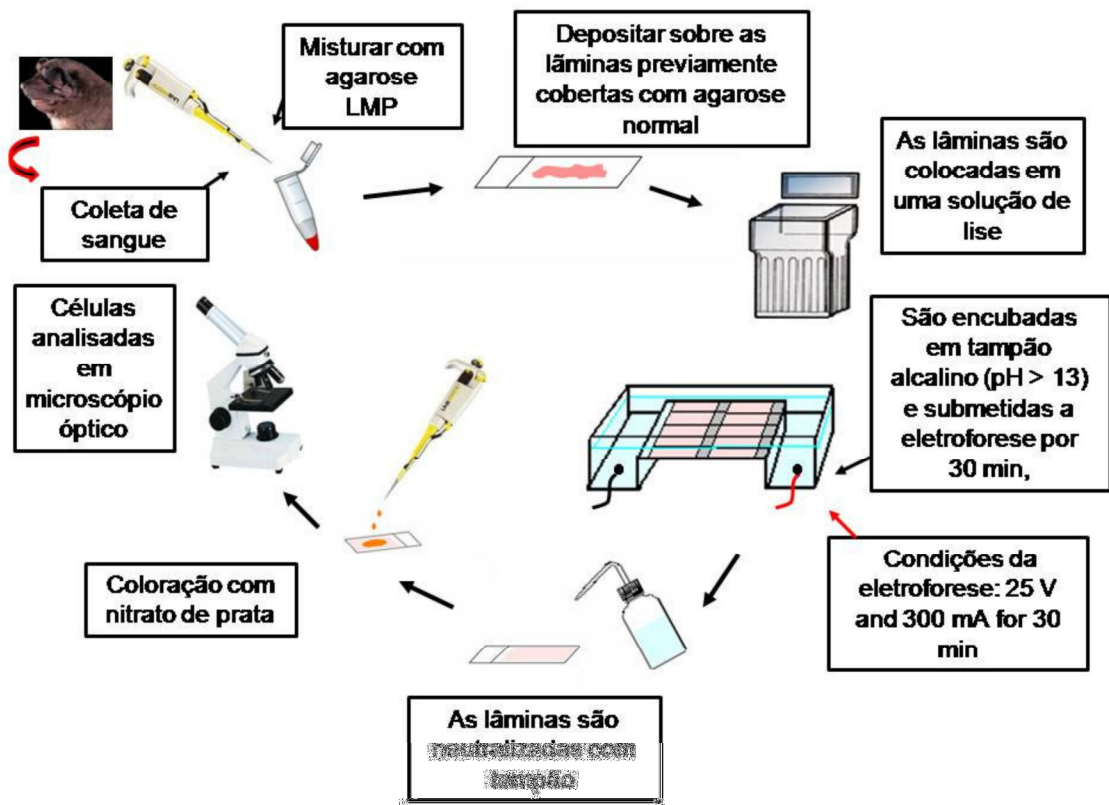


Figura 8: Etapas experimentais do Teste Cometa da coleta das células a leitura em microscópio óptico.

Fonte: Autor.

Quanto à observação ao microscópio, foram analisadas 100 células por indivíduo (50 de cada lâmina duplicada). As células foram classificadas, visualmente, em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda (0 = sem cauda e 4 = comprimento máximo de cauda). Assim, o Índice de Danos (ID) de cada grupo estudado variou de zero ($100 \times 0 = 0$; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 ($100 \times 4 = 400$; 100 células observadas com dano máximo). A frequência de danos (FD em %) foi calculada em cada amostra com base no número de células com cauda versus o número de células sem cauda (Figura 9).

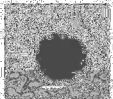
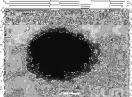
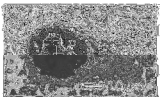
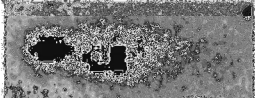
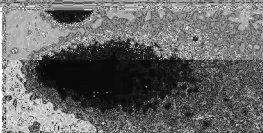
<i>ObservedDNA damage</i>	<i>Head/ Tail</i>	<i>Damage classes</i>
	No tail	0
	≤1	1
	1-2	2
	≥3	3
	No head	4

Figura 9: Classes de Dano obtidas pelo Teste Cometa.

Fonte: VILLELA et al., 2006

3.6 TESTE DE MICRONÚCLEO (MN) EM MEDULA ÓSSEA

O teste de MN em camundongos foi realizado conforme protocolos padrões internacionais (MAVOURNIN et al, 1990). Os animais foram mortos por decaptação, seguindo-se a retirada da medula óssea utilizando-se uma agulha histológica como auxílio. Com este material, foram feitas duas lâminas por animal. Para tal, a medula óssea foi macerada com soro bovino fetal sobre uma lâmina de vidro, fazendo-se um esfregaço direto. Após secagem das lâminas, estas foram coradas com Giemsa 10% em tampão fosfato pH 5.8, por cinco minutos, sendo logo após codificadas para análise às cegas.

Quanto à observação no microscópio, foram analisados 2000 Eritrócitos policromáticos (EPCs) por animal, sendo a detecção dos efeitos de citotoxicidade realizada através da contagem de EPCs em relação aos eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) em 1000 células.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis estão apresentadas como média \pm D.P. de 6 animais para cada tempo em cada grupo. Diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), no caso do ANOVA mostrar diferença significativa, análises post hoc foram feitas através do teste Tukey. Em caso de distribuição não normal as comparações foram feitas através do teste Kruskal-Wallis usando o teste Dunn como post hoc. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico BioEstat 5.0. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

Os resultados do Ensaio Cometa no sangue periférico de animais tratados com o suco de alface orgânico e da mina, bem como o controle salina estão apresentados nas Figuras 10 e 11.

Amostras de sangue periférico foram coletadas no período de 24 horas de exposição, nos tempos 3h, 6h e 24h, com o objetivo de avaliar o possível efeito da administração aguda da alface cultivada sobre rejeitos de carvão no DNA de camundongos adultos.

A análise dos parâmetros Índice de Dano (ID) e (Frequência de Dano (FD) (média + DP) indicou um aumento significativo do grupo alface mina ($P < 0,05$, Teste de Kruskal-Wallis - Dunn) quando comparado aos demais grupos (alface orgânica e salina). Além disso, no tempo de exposição de 24h o grupo alface orgânica também apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo para ID ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis – Dunn).

Quando comparamos os grupos entre os diferentes tempos de exposição foi possível observar diferença significativa apenas no grupo alface orgânica, onde o tempo de 24h foi maior que os tempos 3h e 6h para ID e FD ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis - Dunn).

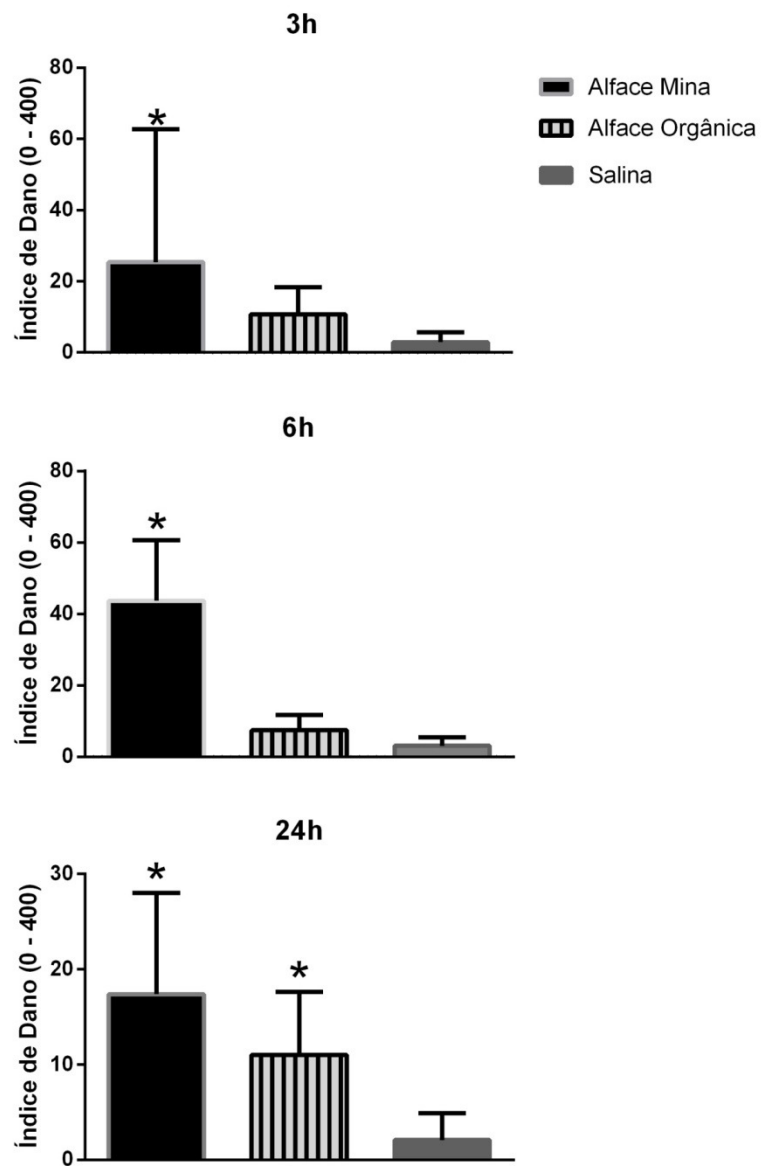


Figura 10: Detecção de dano no DNA através do parâmetro Índice de Dano do Ensaio Cometa em células do sangue periférico de camundongos no período de exposição de 24h,* Diferença significativa em relação aos demais grupos ($P < 0,05$, Teste de Kruskal-Wallis- Dunn).

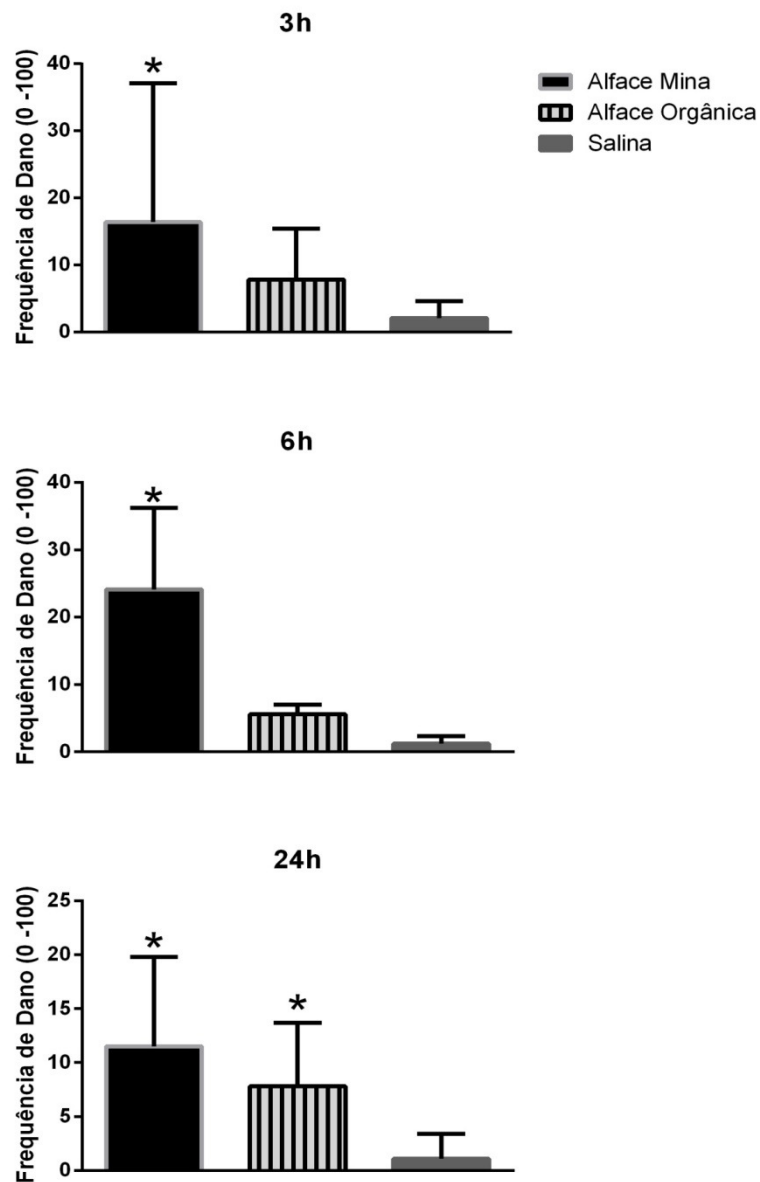


Figura 11: Detecção de dano no DNA através do parâmetro Frequência de Dano do Ensaio Cometa em células do sangue periférico de camundongos no período de exposição de 24h,* Diferença significativa em relação aos demais grupos ($P < 0,05$, Teste de Kruskal-Wallis- Dunn).

Os resultados do ensaio cometa para o fígado e córtex estão apresentados nas figuras 12 e 13. Os parâmetros ID e FD apontaram um aumento significativo nas células do córtex cerebral dos animais tratados com alface da mina quando comparado com os outros grupos ($P < 0,01$ ANOVA -Tukey), no entanto, para as células do fígado as análises estatísticas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

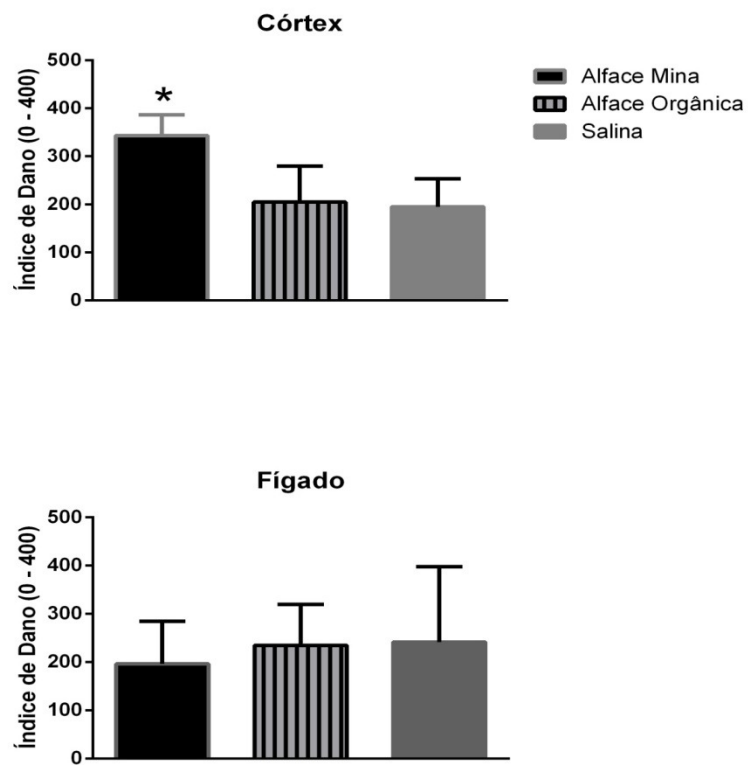


Figura 12: Detecção de dano no DNA através do parâmetro Índice de Dano do Ensaio Cometa em células do córtex cerebral e fígado no período de exposição de 24h.* Diferença significativa em relação aos grupos controle ($P < 0,01$ ANOVA, Tukey).

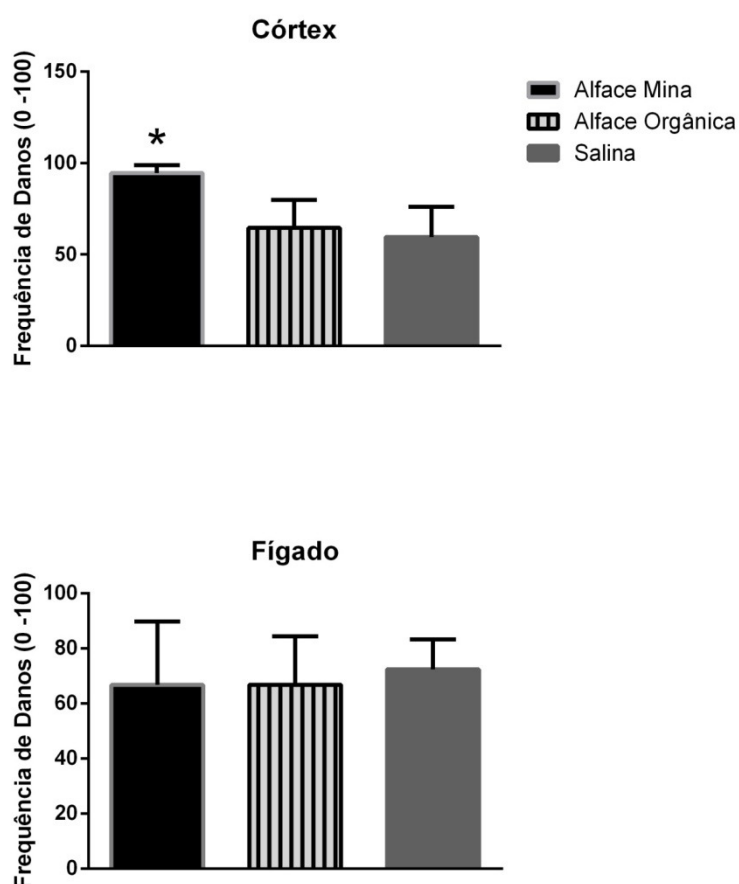


Figura 13: Detecção de dano no DNA através do parâmetro Frequência de Dano do Ensaio Cometa em células do córtex cerebral e fígado no período de exposição de 24h.* Diferença significativa em relação aos grupos controle ($P < 0,01$ ANOVA, Tukey).

A figura 13 ilustra os resultados do teste de Micronúcleos em medula óssea dos camundongos tratados com os dois tipos de alfaces e controle negativo (salina) sob dois aspectos: relação EPC/ENC (parâmetro de toxicidade) e a frequência de micronúcleos (parâmetro de mutagenicidade). Estatisticamente os resultados não apresentaram diferenças significativas com valores de $P > 0,05$ (Kruskal-Wallis-Dunn) para a relação de EPC/ENC e para frequência de micronúcleos.

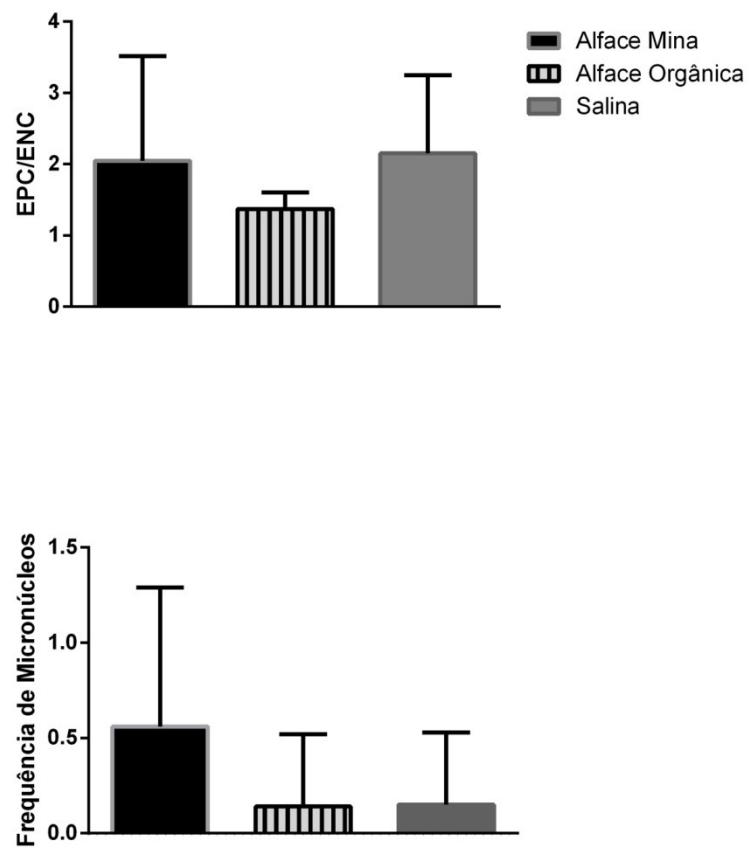


Figura 14: Relação EPC/ENC e frequência de micronúcleos na medula óssea dos animais de todos os tratamentos no período de 24h de exposição.

5 DISCUSSÃO

A mineração de carvão é umas das atividades de exploração com maior potencial poluidor, contendo uma mistura heterogênea de mais de 50 elementos, incluindo os óxidos e outros elementos como sílica, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), metais pesados e cinzas (LÉON et al., 2007).

Muitos desses elementos estão presentes nos rejeitos do carvão, enriquecidos com substâncias genotóxicas e com alto risco tóxico, podendo provocar alterações nas células, tecidos, populações e ecossistemas (AGOSTINI et al. 1996; SA'NCHEZ-CHARDI et al., 2007, 2008). Igualmente aos animais, as plantas também podem ser danificadas quando expostas ao excesso de metais pesados em seu ambiente de crescimento (CARDOSO; NAVARRO; NOGUEIRA, 2003).

Em todos os trabalhos sobre genotoxicidade relacionados ao carvão, não ocorreu pontuação de um agente causador específico. Acredita-se que pela complexidade da interação biológica e ambiental, não seja possível distinguir um agente genotóxico no carvão e nos seus subprodutos. Sabe-se porem que a pirita, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e os metais pesados, são alguns desses agentes causadores de dano (COHN, et al., 2006; MEIRE; AZEVEDO; TORRES, 2007; BEYERSMANN; HARTWIG, 2008).

Exposições crônicas e/ou agudas aos metais pesados podem dar origem a uma variedade de doenças patológicas em animais, e praticamente todos os metais podem causar toxicidade quando ingeridos em altas quantidades, mas diversos elementos como Pb, Fe, Mn, Cu, Cd, Ni e Al são muito abrangentes, podendo produzir toxicidade até mesmo em concentrações muito baixas (BROOKS , 1983; BEYERSMANN; HARTWIG, 2008).

Neste trabalho foram aplicados dois testes citogenéticos, o ensaio cometa e o teste do micronúcleo, empregados para avaliar o potencial genotóxico e mutagênico ao DNA de camundongos expostos ao suco de folhas da alface cultivada em área minerada de carvão na forma de tratamento agudo com o objetivo de avaliarmos os riscos à saúde humana, uma vez que esta horta é utilizada para consumo dos mineradores da própria mina de carvão.

O ensaio cometa apresenta aplicabilidade em qualquer organismo eucarioto e qualquer tipo celular, além do pouco tempo requerido para se obter os

resultados. Estas propriedades fazem com que este teste tenha grande utilidade como uma avaliação da genotoxicidade ambiental (SILVA, 1999).

Nos nossos resultados do ensaio cometa em sangue periférico, o grupo alface mina apresentou resultados com valores estatísticos significativamente mais altos que todos os outros grupos, demonstrando a toxicidade genética da alface cultivada em uma área de exploração de carvão em relação à alface orgânica e solução salina. Além disso, foi possível comprovar a sensibilidade do sangue periférico como um biomarcador de dano e validar os resultados anteriores de biomonitoramento feitos com caracóis de jardim com esta hortaliça de área minerada (Leffa et al., 2010).

Quando os grupos foram comparados em seus diferentes tempos de exposição, apenas o grupo alface orgânica, apresentou valores mais elevados no tempo de 24h, no entanto, mesmo havendo diferença estatística, biologicamente esta diferença não é relevante, pois os valores são muito baixos, dentro do limite considerado normal para este teste.

No que se refere aos dados do córtex cerebral, os animais dos três grupos, em ambos os parâmetros do ensaio cometa apresentaram resultados com valores aumentados, mas ainda assim o grupo alface mina teve aumento significativo quando comparado com o controle negativo e alface orgânica.

Estudos sobre a genotoxicidade do carvão são cada vez mais encontrados na literatura (SILVA et al., 2000), pesquisas realizadas utilizando o ensaio cometa com o roedor *Ctenomys torquatus* demonstraram que o carvão e seus subprodutos não apenas induziram danos em DNA de células sanguíneas, como também produziram efeitos genotóxicos no organismo como um todo. Para Léon et al. (2007) os mamíferos *Rattus rattus* e *Mus musculus* expostos a áreas mineradas por carvão, apresentaram valores significativamente maiores de índice de danos (ID) e frequência de danos (FD) quando comparados aos animais da área controle, demonstrando também o efeito genotóxico desse mineral. Além disso, estudo com o ensaio cometa e teste de micronúcleos de Silva et al. (2000) realizado em minas de carvão no Rio Grande do Sul mostrou que o carvão e seus derivados provocam danos no DNA em diferentes tecidos de *Ctenomys torquatus*, um roedor fossorial.

Vilatoro-Pulido et al. (2008) detectaram genotoxicidade em uma planta utilizada como fonte alimentícia, sendo que a mesma foi vinculada a exposição de

metais pesados (As, Pb e Cd) oriundos do solo de uma área próxima a uma mineradora de pirita. Os resultados apresentaram contaminação tanto das raízes quanto das partes comestíveis, constituindo-se assim um risco para toda a cadeia alimentar, devido aos efeitos nocivos desses metais.

Conforme Clemens (2006) a absorção e acúmulo de metais tóxicos em vegetais representa a principal via de entrada potencialmente perigosa para a saúde a partir da alimentação humana e animal. Entre estes metais, destacam-se os metalóides As, Se, Cd, Hg e Pb devido os seus efeitos nocivos. O autor destaca ainda, que as plantas possuem uma tolerância a níveis elevados dos metais, o que pode tornar mais prejudicial ainda o consumo destes vegetais para os consumidores.

Leffa et al. (2010) realizaram estudos com caracóis expostos a alface cultivada em área minerada, onde mostrou um aumento nos danos de linfócitos periféricos comparados ao controle. No entanto, o sistema de reparo de DNA mostrou-se eficiente, mas ainda assim mantendo os valores aumentados. Para o fígado os valores obtidos no nosso trabalho não apresentaram diferenças significativas entre os grupos tratados. Os metais pesados e seus subprodutos convertem-se em elementos tóxicos quando não são metabolizados pelo organismo e acumulam-se nos tecidos moles, já que os seres vivos não são capazes de excretá-los de forma eficaz – bioacumulação. O processo de biotransformação também gera espécies reativas de oxigênio, as quais também danificam o DNA. Estes mecanismos podem ter um efeito sinérgico na presença de outros poluentes ambientais, tais como os metais pesados, potencializando a sua genotoxicidade (LOPES, 2009).

No estudo de Agostini et al. (1996), realizado com trabalhadores de uma mineradora em Criciúma, verificou-se a existência de um risco aumentado de mutagenicidade observado através da diminuição do índice mitótico, aumento de micronúcleos em células bucais e lesões cromossômicas em células de sangue periférico.

O conhecimento dos mecanismos de ação dos metais pesados é relevante não só para identificar os possíveis alvos e respectivos biomarcadores de efeitos, mas também para melhorar a determinação de elementos, por exemplo, na escolha do meio biológico mais apropriado.

Os efeitos induzidos pelos metais são variados, desde efeitos tóxicos sistêmicos, irritantes, agudos ou crônicos a efeitos teratogênicos, mutagênicos e cancerígenos (TAVARES; CARVALHO, 1992).

Para os nossos resultados é preciso também considerar o adoecimento dos camundongos do grupo alface orgânica que apresentaram no dia do experimento, hematúria e feridas pelo corpo e cauda, levando a um suposto estresse comportamental dos animais, que também pode levar a um estresse oxidativo, causando danos ao DNA dos animais, porém, também podem ser atribuídos ao dano mecânico, exercido com a maceração das estruturas para confecção das lâminas.

Com base nos parâmetros do ensaio cometa (FD e ID), e nos diferentes tecidos, vale destacar que o sangue periférico é o melhor indicador para o ensaio cometa, por ter aspecto fluído e não necessitar de maceração para confecção da lâmina, assim não sofrendo interferência por dano mecânico.

Em relação à frequência de micronúcleos e a relação dos EPC/ENC, os valores obtidos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Supomos que, pelo fato de os animais terem sido submetidos a um tratamento agudo e o teste avaliar danos que já passaram pelo processo de reparo, o experimento necessitaria de um tempo maior de exposição para apresentar valores significativos, sugerindo um tratamento crônico para comparação.

De fato, o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo possuem naturezas distintas, cada um com suas vantagens e restrições e, por isso, têm sido aplicados em conjunto para a avaliação de danos genéticos. Enquanto o ensaio cometa detecta lesões reversíveis, o teste do micronúcleo detecta lesões mais persistentes no DNA ou efeitos aneugênicos que não podem ser reparados. Os danos mensurados pelo ensaio do cometa aparecem mais cedo do que o Micronúcleo, que requer uma divisão celular para ser visualizado. Além disso, nem sempre a formação de um micronúcleo ocorre na primeira divisão celular, pois um fragmento acêntrico pode sobreviver, replicar e se transformar em micronúcleo em divisões subsequentes (SOUZA, 2005).

O ensaio do cometa, por ser uma técnica bastante sensível, deve ser aplicado com bastante cuidado para que não sejam realizadas interpretações equivocadas dos resultados obtidos, e tais dados podem ser relevantes na avaliação

dos riscos que estas populações expostas à mineração de carvão estão sujeitas (SANTOS, 1999).

6 CONCLUSÃO

Dessa forma os resultados encontrados nesse estudo apontam a sensibilidade do ensaio cometa e sugerem um período maior de exposição para avaliar melhor a mutagenicidade através do teste de micronúcleo.

Mesmo assim os nossos resultados demonstraram um potencial genotóxico dos rejeitos de carvão aos mamíferos, validando o suposto risco em que a população que ingere vegetais cultivados em área minerada ou próxima a esta está sujeita. Adicionar estudos com amostras maiores, outros vegetais e tratamento crônico seriam atraentes a fim de corroborar os resultados obtidos neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, J.M.S. et al. A. Chromosome damage in underground coal miners: detection by conventional cytogenetic techniques and by submitting lymphocytes of unexposed individuals to plasma from at-risk groups. **Brazilian Journal of Genetics**. v. 19, n.4, p. 641-646, 1996.
- ANDRADE JÚNIOR, A.S. de; KLAR A.E. Manejo da irrigação da cultura da alface (*Lactuca sativa* L.) através do tanque classe A. **Sci. agric**. v. 54, n. 2, Piracicaba, Jan./Ago. 1997.
- ANDRADE, V.M. et al. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, n. 5, p. 459-468, 2004.
- ANEEL, Agência Nacional de Energia Elétrica. **Fontes não renováveis de carvão mineral**. Cap. 9, Parte III, Atlas de Energia Elétrica do Brasil. ANEEL, 2007.
- ALVES, A.C.B.; SILVANO, S. Avaliação da sensibilidade de *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladóceras, Crustácea) ao dicromato de potássio. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.65, n.1, p. 59-61, 2006.
- ARIAS, A.R.L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde**, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.
- BARBÉRIO, A. et al. Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico da água do Rio Paraíba do Sul através do teste *Allium cepa*. **Braz. J. Biologia**, n. 69, v. 3, p. 837-842, 2009.
- BARBOSA, J.P. **Projeto conceitual para recuperação ambiental da bacia carbonífera sul catarinense**. Centro de Tecnologia Mineral CETEM / MCT. v. 1, jan. 2001.
- BARRONCAS, P.S.R. **Estudo de metais pesados oriundos do aterro sanitário (Km 19 – Rodovia AM 010) e sua distribuição ao longo dos Igarapés Matrinxã, Bolívia, Tarumã e Rio Negro (Manaus – AM)**. [Dissertação de Mestrado]. Universidade do Amazonas, Manaus, 1998.

BENASSI, J.C. **O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de efluente de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana.** [Dissertação de Mestrado em Biotecnologia]. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2004.

BENAVIDES, M.P.; GALLEGOS, S.M.; TOMARO, M.L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 21-34, 2005.

BORTOLOTO, T. **Avaliação da atividade tóxica e genotóxica de percolados do aterro sanitário municipal de Sombrio, Santa Catarina, utilizando *Artemia sp.* e *Allium cepa* L.** [Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas]. Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma, 2007.

BOSCHI, A. et al. **Novel Tc-99m Radiotracers for Brain Imaging.** Special Number, v. 50, p. 37-44, September 2007.

BRANDÃO, R.A. Avaliação ecológica rápida da Herpetofauna nas reservas extrativistas de Pedras Negras e Curralinho, Costa Marques, RO. **Brasil Florestal**, n. 74, p. 61-73, 2002.

BRASIL, Departamento Nacional de Produção Mineral - DNPM. 2007. **Informativo Anual da Indústria Carbonífera.** Brasília. Disponível em: <<http://www.dnpm.gov.br>>. Acesso em: 20 abr. 2012.

BRASIL, Departamento Nacional de Produção Mineral - DNPM. **Informe Mineral: Desenvolvimento e economia mineral.** Brasília, 2004. Disponível em: <www.dnpm.gov.br/informe_mineral>. Acesso em: 10 set. 2012.

BROMENSHENK, J.J.; SMITH, G.C.; WATSON, V.J. **Biomonitors and Biomarkers as Indicators of Environmental Change.** New York: Plenum Press, 1995.

BROOKS, R.R. **Biological methods of prospecting for minerals.** New York: Wiley-Interscience, 1983. 322p.

CAMARGO M. **Citometría de flujo y genética en el análisis de estrés oxidativo por contaminantes ambientales y ocupacionales.** Resumen in IV Congreso Internacional y VII Congreso Colombiano de genética, v. 38, n. 1, Bucaramanga, 2006.

CAMPOS, M.L.; ALMEIDA, J.A., SOUZA, L.S. Avaliação de três áreas de solo construído após mineração de carvão a céu aberto em Lauro Müller, Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência e Solo**, v. 27, p. 1123-1137, 2003.

CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, v. 88, p. 1707-1719, 2006.

CARDOSO, E.J.B.N.; NAVARRO R.B.; NOGUEIRA M.A. Absorção e translocação de manganês por plantas de soja micorrizadas, sob doses crescentes deste nutriente. **Revista Brasileira Ciência e Solo**, v. 27, p. 415-423, 2003.

COSTA, S. **Estrutura da vegetação herbáceo-arbustiva dos solos construídos em áreas mineradas de carvão a céu aberto e a relação de *Axonopus obtusifolius* (Raddi) Chase com Mn e Pb.** [Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais]. Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Criciúma, 2007.

COSTA, S.; ZOCHE, J.J. Fertilidade de solos construídos em áreas de mineração de carvão na região sul de Santa Catarina. **Revista Árvore**, v. 33, p. 665-674, 2009.

COSTA, S.; ZOCHE, J.J.; SOUZA, P.Z. Absorção de metais pesados (Zn e Pb) por *Axonopus obtusifolius* (Raddi) em áreas degradadas pela mineração de carvão, SC, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 795-797, Porto Alegre, 2007.

DAMIANI, A. P. **Metais pesados e danos no DNA de células sanguíneas de morcegos insetívoros em áreas de mineração de carvão da bacia carbonífera catarinense.** [Trabalho de Conclusão de Curso]. Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Criciúma, 2010.

FAIRBAIRN, D. W; OLIVE, P.L; O'NEIL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**. n. 339, p. 37-59. Canadá, 1994.

FARIAS, C.; GOMES, E. **Mineração e meio ambiente:** relatório preparado para o CGEE. Porto Alegre, 2002. Disponível em: <<http://www.cgee.org.br>>. Acesso em: 03 set. 2012.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 11, p. 125-132, jan. 2011.

FRANCHI, L.P. et al. Citotoxicidade e genotoxicidade de nanotubos de carbono. **Quim. Nova**, v. 35, n. 3, p. 571-580, 2012

FREITAS, M.; ZOCHE, J.J; ESSEMAM DE QUADROS, K. Metais pesados (Mn e Zn) em *Typha domingensis* Pers. em áreas de mineração de carvão. **Revista Brasileira de Biociências**. 2007.

GAMEIRO, P.H. **Efeito antimutagênico do extrato aquoso de *agaricus brasiliensis* em cultura de linfócitos humanos**. [Trabalho de Conclusão de Curso]. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

GASTALDO, J. et al. Induction and repair rate of DNA damage: a unified model for describing effects of external and internal irradiation and contamination with heavy metals. **Journal of Theoretical Biology**, v. 251. p. 68-81, 2009.

GOMES, A.M. et al. Carvão fóssil. **Estudos avançados**, v. 12, n. 33, p. 89-106, Porto Alegre, 1998.

GONTIJO, A.M. de M.C.; TICE, R. Teste do Cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. **Mutagenese Ambiental**. ULBRA, Canoas, 2003, p 247-271.

GRASSI, L.E.A. **Uso da técnica de micronúcleos para avaliação de genotoxicidade em peixes dos rios Jaguari e Atibaia – Bacia Hidrográfica do Rio Piracicaba – São Paulo – Brasil**. [Tese de Doutorado em Zoologia]. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2002

GUO L.; YANG, J.Y.; WU, C.F. Oxidative DNA Damage Induced by Ethanol in Mouse Peripheral Leucocytes. **Basic e Clinical Pharmacology e Toxicology**, p.1742- 7843, 2008.

HAYASHI M.; TICE R. et al. *In vivo* rodent erythrocyte Micronucleus assay. **Mutation Res.** v. 312, p. 293-304, 1994.

HEDDLE, J.A. A rapid *in vivo* test for chromosome damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v.18, p. 187-192, 1973.

HEDDLE, J.A. et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 18, p. 277-291, 1991.

HEDDLE J.A. et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Res.** v. 123, p. 61-118, 1983.

HENRIQUES, J.A.P. et al. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. Biotecnologia **na agricultura e na agroindústria**. Editora Agropecuária, Guaíba, 2001.

HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 277, p. 91-138, 1992.

KLEIN, A.S. **Áreas degradadas pela mineração de carvão no Sul de Santa Catarina: vegetação versus substrato**. [Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais] .Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Criciúma, 2006.

KOVALCHUK, I.; KOVALCHUK, O. Transgenic Plants as Sensors of Environmental Pollution Genotoxicity. **Sensors**, v. 8, p. 1539-1558, 2008.

LEFFA, D.D. et al. Evaluation of the Genotoxic Potential of the Mineral Coal Tailings Through the *Helix aspersa* (Müller, 1774). **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 59, n. 4, p. 614-621, 2010.

LEFFA, D.D.; ANDRADE, V.M. **Potencial genotóxico de metais em áreas mineradas de carvão**. Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Criciúma, v. 4, n. 1, 2008.

LEMONS, C.T.; TERRA, N.R. Poluição: causas, Efeitos e Controle. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003, p. 117-144.

LEÓN, G. et al. Genotoxic effects in wild rodents (*Rattus rattus* and *Mus musculus*) in an open coal mining area. **Mutation Research**, v. 630, p. 42-49, 2007.

LIAO, W.; MCNUTT, M.A, ZHU, W.G. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 48, n. 1, p. 46-53, may, 2009.

LIMA, C.V.S. de. **Potencial de fitoextração do nabo forrageiro e da aveia preta em argissolo contaminado por cádmio**. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

LOPES, A.M.A. L. **Avaliação do risco de contaminação ambiental utilizando como bioindicador o ratinho-caseiro (*Mus Musculus*)**. [Dissertação de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente]. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, 2009.

LOPES, R.P.; SANTOS, E. L.; GALATTO, S.L. **Mineração de carvão em SC: geologia, geoquímica e impactos ambientais**. Curitiba: Jurerá Editora, 2009.

MANZINI, F.F.; SÁ, K.B.; PLICAS, L.M.A. **Metais pesados: fonte e ação toxicológica**. Fórum Ambiental da Alta Paulista. Periódico Eletrônico, v. 6, 2010.

MARTINS, A.A. **Sócio-economia do carvão em Santa Catarina: uma contribuição ao estudo de sua trajetória**. [Dissertação de Mestrado em Economia]. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis, 2005.

MAVOURNIN, K.H. et al. The in vivo Micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Gene-Tox Program. **Mutat Res**, v. 239 p. 29-80, 1990.

MEJÍA, G.L. **Avaliação dos efeitos genotóxicos e citogenéticos na população de trabalhadores de mineração de carvão de Cerrejón (Guajira – Colômbia) utilizando diferentes biomarcadores**. [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre/RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

MILIOLI, G.; SANTOS, R. dos.; ZANETTE, V.C. **Mineração de carvão, meio ambiente e desenvolvimento sustentável no sul de Santa Catarina**. Curitiba: Juruá, p. 315, 2009.

MORAES, S.P.V. **Impacto do lobo de esgoto na comunidade bacteriana do solo: avaliação por microarranjo de DNA**. [Tese de Doutorado]. Universidade Estadual Paulista – UNESP. São Paulo, 2008.

ÖSTLING, O.; JOHANSON K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem. Biophys. Research Communications*, v.123, p. 291-298, 1984.

PARAÍBA, L.C. et al. Fator de bioconcentração de poluentes orgânicos de lodos em frutos de laranjeiras. **Revista ecotoxicologia e meio ambiente**, Curitiba, v. 16, p. 125-134, 2006.

PASCALLICCHIO, A.E. **Contaminação por metais pesados: Saúde Pública e Medicina Ortomolecular.** São Paulo: Anna Blume, 2002.

PÉREZ-ESPITIA, L. **Influência de polimorfismo em genes de metabolismo de xenobióticos e reparação de DMA no risco ocupacional de mineiros de carvão a céu aberto.** [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

PORTO, L.C.S. **Avaliação de metais pesados e micronúcleos em peixes da bacia hidrográfica Butuí-Icamaquã e análise da água.** [Dissertação de Mestrado]. Centro Universitário Univates – UNIVATES, Lajeador/RS, 2009.

PRONCHOW, T.R.; PORTO, M.L. Avaliação de uma área de rejeitos da mineração de carvão com vistas a bioindicadores vegetais para metais pesados. In: CENTRO DE ECOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **Carvão e meio ambiente.** Porto Alegre: Editora da Universidade, 2000, p. 673-694.

QUADROS, A. F. Os isópodos terrestres são boas ferramentas para monitorar e restaurar áreas impactadas por metais pesados no Brasil? **Oecologia Australis**, v. 2, n. 1, p. 569-583, jun. 2010.

RAMALHO, J.F.G.P.; SOBRINHO, N.M.B.A.; VELLOSO, A.C.X. Contaminação da microbacia de Caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 35, n. 7, p. 1289-1303, jul. 2000.

RIBEIRO, J.T.M.; FERREIRA, G.C. **Mineração subterrânea de carvão X comunidade no seu entorno: um exemplo de Santa Catarina.** Rev. Esc. Minas, Ouro Preto, n. 60, v. 3, p. 459-464, jul./set. 2007

RIBEIRO, K.A.F.; DANIELSKI, L.F.; ZOCHE, J.J. **Metais pesados em hortaliças cultivadas sobre depósito controlado de rejeitos de carvão.** 1º Seminário de Pesquisa, Extensão e Inovação do IF-SC. Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, Criciúma, 2011.

SA'NCHEZ-CHARDI, A. et al. Haematology, genotoxicity, enzymatic activity and histopathology as biomarkers of metal pollution in the shrew *Crocidura russula*. **Environ Pollut**, v. 156, p. 1332-1339, 2008

SANTOS, I.C.; CASALI, V.W.D.; MIRANDA, G.V. Teores de metais pesados, K e Na, no substrato, em função de doses de composto orgânico de lixo urbano e de cultivares de alface. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 415-421, 1999.

SCHILDERSMAN, P.A.E.L. et al. Possible Relevance of Pigeons as an Indicator Species for Monitoring Air Pollution. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, n. 3, p. 322-330, 1997.

SCHIMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. **Plenum Press**, New York, v. 4, p. 31-53, 1975.

SEGOVIA, J.F.O. et al. Comparação do crescimento e desenvolvimento da alface (*lactuca sativa* L.) No interior e no exterior de uma estufa de polietileno em Santa Maria, RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.1, p.37-41, 1997.

SILVA, E.C.; FREGONEZE, J. Efeitos de metais pesados sobre o controle central do equilíbrio hidroeletrolítico. **Rev. Ci. Méd. Biol.**, Salvador, v. 1, n. 1, p. 116-123, nov. 2002.

SILVA, G.A. **Avaliação da genotoxicidade do extrato de Mikania Laevigata no dano em DNA causado pela explosão aguda a poeira do carvão.** [Dissertação de Mestrado]. Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Criciúma, 2008.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica.** Porto Alegre: Alcance, 2003, p 424.

SILVA, J. et al. Genotoxicity Biomonitoring in Coal Regions Using Wild Rodent *Ctenomys torquatus* by Comet Assay and Micronucleus Test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 270-278, 2000.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p.184-191, 1988.

SOARES, E.R. et al. Cinza e carbonato de cálcio na mitigação de drenagem ácida em estéril de mineração de carvão. **Revista Brasileira de Ciência e Solo**, v. 30, p. 171-181, 2006.

SOUZA, T.S. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do Rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo, utilizando *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) como organismo-teste.** [Dissertação de Mestrado]. Universidade Estadual Paulista - UNESP. São Paulo, 2005.

SOUZA, P.Z. de; COSTA, S.; ZOCHE, J.J. *Baccharis trimera* Less. DC. como Indicadora da recuperação de áreas mineradas de carvão. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 702-704, 2007.

TAVARES, T.M.; CARVALHO, F.M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos de recôncavo baiano. **Rev. Química Nova**, v. 15, n. 2, p. 147-154, 1992.

TICE, R.R. et al. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TICE, R.R. **Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change**. New York: Plenum Press. p. 69-79. 1995.

VILLATORO-PULIDO, M. et al. Modulation of genotoxicity and cytotoxicity by radish grown in metal-contaminated soils. **Mutagenesis Advance Access published September**, v. 28, 2008.

VILLELA, I.V. et al. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research**, v. 605, p.78-86, 2006.

WILD, D. Cytogenetic effects in the mouse of chemical mutagens and carcinogens evaluated by micronucleus test. **Mutation Res**, v. 56, p. 319-327, 1978.

ZOCHE, J.J. **Efeitos da mineração de carvão sobre os morcegos no sul de Santa Catarina**: a presença de metais pesados e a ocorrência de danos celulares. In: IV Congresso Brasileiro de Mastozoologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IV, 2008, São Lourenço, MG. São Lourenço, 2008. p.1-10.

ZOCHE, J.J. **Metais pesados (Fe, Mn e Zn) no solo construído e na vegetação das antigas bacias de decantação do lavador de Capivari, Capivari de Baixo, SC**. In: Simpósio Nacional e Congresso Latino-Americano de Recuperação de Áreas Degradadas, Curitiba: Sobrade, 2005. p.117-124.

ZOCHE, J.J.; FREITAS, M.; QUADROS, K. E. Concentração de Zn e Mn nos efluentes do beneficiamento de carvão mineral e em *Typha domingensis* PERS (Typhaceae). **Revista Árvore**, v. 34, p. 1077-1088, 2010.

ZOCCHÉ, J.J.; LEFFA, D.D.; DAMIANI, A.P. Heavy metals and DNA damage in blood cells of insectivore bats in coal mining areas of catarinense coal basin, Brazil. **Environmental Research**, New York, 2010.

ZOCCHÉ, J.J.; PORTO, M.L. Ecologia de Paisagem na microbacia do Arroio Camaquã das Lavras, Lavras do Sul, RS: uso, cobertura do solo e distribuição de associações vegetais na Savana Metalófila. In: Maria Luiza Porto. **Comunidades vegetais e fitossociologia**: fundamentos para a avaliação e manejo de ecossistemas. v. 1, n. 1, p. 195-220. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2008.

ZOCCHÉ, J.J.; PORTO, M.L. Florística e fitossociologia de campo natural sobre banco de carvão e áreas mineradas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta bot. bras.** n. 6, v. 2, p. 47-84, 1992.